

PCT/EP 98 / 05899  
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND  
EP 98 05899

09/508095

REC'D	20 NOV 1998
WIPO	PCT



EV

## PRIORITY DOCUMENT

### Bescheinigung

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Herr Professor Dr.med.Dr.h.c. Wolf-Georg F o r s s m a n n  
in Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der  
Bezeichnung

"Verfahren zur Gewinnung, Herstellung und Anwen-  
dung von bifidogenen Peptiden aus der Milch des  
Menschen und des Rindes"

am 16. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 07 K, A 61 K und A 23 J der Internationalen Patent-  
klassifikation erhalten.

München, den 28. November 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

*Weber*

Anhängerzeichen: 197 40 604.1

*Wehner*

49 511 53045 10



16-09-98

54 **Verfahren zur Gewinnung, Herstellung und Anwendung von bifidogenen Peptiden aus der Milch des Menschen und des Rindes**

57 **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren basische Peptide aus Menschen und Kuhmilch zu gewinnen, die die Eigenschaft haben, Bifidobakterien zu fördern und sich so auf die Zusammensetzung der natürlichen Darmflora des Menschen auswirken. Bei diesen Peptiden handelt es sich um Teilfragmente aus Milchproteinen, wie Caseinen, Lactoferrinen, Lysozym, Albumin, Immunglobulinen, wie sie transient bei der Verdauung entstehen. Diese Vorläufer sind nicht bifidogen und erst nach ihrer Proteolyse werden bestimmte bifidogene Peptide freigesetzt, die hier erstmalig beschrieben werden. Diese Komponenten wirken einzeln und ergänzen sich in ihrer Wirkung, so daß sie einzeln oder in Kombination zur Modulation einer bakteriellen Flora verwendbar sind.

511 53045 10

## Beschreibung

Von Milch ist bekannt, daß sie fördernd auf den Gesundheitszustand von Säuglingen wirkt. Dies wird vielfach auf den Einfluß der Milch auf die Ausbildung einer säuglingstypischen Darmflora zurückgeführt, die zu mehr als 90% aus *Bifidobacterium bifidum* besteht. Bislang ist unklar welche Faktoren für die Ausbildung dieser Darmflora verantwortlich sind. Diese Erfindung betrifft Peptide, die in der Milch des Menschen und des Rindes vorliegen, die folgendes gemeinsam haben: sie wirken antimikrobiell gegen Bakterien, die in der natürlichen Säuglingsflora gar nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen und fördern das Wachstum von „erwünschten“ Bakterien wie *Bifidobakterien* indem sie diese Bakterien im Wachstum stärker als andere Bakterien anregen oder nur die nichterwünschten Bakterien selektiv hemmen. Diese Eigenschaft *Bifidobakterien* einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, wird nachfolgend als bifidogen bezeichnet. Die Zusammensetzung der Milch hinsichtlich seines Peptidspektrums ist komplex. Bifidogene Peptide entstehen im wesentlichen durch Proteolyse aus verschiedenen Milchproteinen.

Es kann davon ausgegangen werden, daß sich die bifidogenen Peptide der Milch in ihrer Wirkung ergänzen, wenn mehrere dieser Peptide kombiniert sind, um eine optimale Wirkung und Selektivität für *Bifidobakterien* zu erhalten.

Erfindung betrifft die Entdeckung und Verwendung dieser Peptide als Einzelstoffe und als Kombinationspräparat diesen Synergismus ausnutzend zur Verwendung als Arzneistoff, als Lebensmittelzusatz, als Konservierungsmittel und als Fermentationshilfsstoff. Der Wert der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die vorgestellten bifidogenen Peptide als mikrobielle Wachstumsmodulatoren aus biologisch verträglichen Grundstoffen hergestellt werden können, die als Nahrungsmittel lange im Gebrauch des Menschen stehen und unbedenklich sind. Das unterschiedliche Wirkungsspektrum jedes Einzelstoffes erlaubt es beim Vorliegen von Resistenzen von Mikroorganismen durch eine geeignete Kombination oder durch die Auswahl der Einzelsubstanz eine optimale Hemmung von unerwünschten Mikroorganismen zu erzielen.

49 511 53045 10

**Beispiel 1:****Behandlung von Milch**

Humane Milch wurde mit Pepsin (20 mg/g Protein) versetzt, nachdem sie mit HCl auf einen pH von 3.5 eingestellt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde für 2 Stunden bei 37° C inkubiert und durch Kochen für 5 Min gestoppt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 60000 g bei 4° C) und das Milchfett abgeschöpft. Die verbliebene Lösung wurde mit 0.1 % TFA versetzt und erneut zentrifugiert, um ausgefallene hochmolekulare Proteine abzutrennen.

**Beispiel 2:****HPLC Reinigung eines bifidogenen Peptides aus Milch**

Für die Reinigung von bifidogenen Peptiden aus Milch müssen verschiedene HPLC Trennverfahren miteinander kombiniert werden, um eine möglichst reine Darstellung über eine optimale Trennleistung zu erzielen und inaktive, unerwünschte Bestandteile abzutrennen. Die jeweiligen Proben, die nach jedem Trennungsschritt entstehen, müssen in zwei Testsysternen getestet werden, d.h. ein Wachstumstest mit Bifidobakterien in Kombination mit einem Wachstumstest mit *E. coli* als Target. (siehe Beispiel 3 - 4). Notwendig für die Reinigung ist die Kombination von mindestens zwei unterschiedlichen Reverse-Phase Chromatografieschritten und der Einsatz eines Kationenaustausch-HPLC-Trenngangs. In den Biotest muß die jeweilige Probe salzarm (<10 mM) eingesetzt werden, um ein möglichst optimales Screeningergebnis zu erhalten. Das gewünschte Screeningergebnis „bifidogene“ Aktivität heißt:

In einem kombinierten Wachstumstest eine Veränderung in der Keimzahl gegenüber wirkstofffreien Kontrollen bei einer Inkubationszeit von mindestens 16 Stunden feststellbar ist, die bei Verwendung von *Bifidobakterium bifidum* in 50 % Elliker Broth bei einer Dosis von 200 µg/ml  $\geq -25\%$  beträgt und gleichzeitig bei dieser Dosis die Wirkung auf *E. coli* in 3 g / l Tryptic Soy Broth  $\leq -75\%$  beträgt.

511 53045 10

Oder alternativ: In einem kombinierten Wachstumstest eine Veränderung in der Keimzahl gegenüber wirkstofffreien Kontrollen bei einer Inkubationszeit von mindestens 16 Stunden feststellbar ist, die bei Verwendung von Bifidobakterium bifidum in 50% Elliker Broth bei einer Dosis von 200 µg/ml ≥ +20% beträgt und gleichzeitig bei dieser Dosis die Wirkung auf E. coli oder Staphylococcus carnosus in 3 g / l Tryptic Soy Broth ≤ +5 % beträgt.

Nur diese Fraktionen werden weiter gereinigt, die diese Bedingungen erfüllt haben.

Folgendes Beispiel einer durchgeföhrten Reinigung eines bifidogenen Wirkstoffes, wird anhand

| Peptides „humanes casein-κ-63-117“ dargelegt:

Das Peptid hat die Sequenz

YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF

wie abschließend mittels Massenspektrometrie und Aminosäuresequenzierung festgestellt wurde.

Der erste Trennschritt wurde mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12.5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt (siehe Bild). Fraktion 23 enthielt humanes casein-κ-63-117 mit einer starken Aktivität.

Puffer A: 0.1 % TFA

Puffer B: Acetonitril mit 0.1 % TFA

Gradient: 0-60% B in 45 Min

Fluß: 2 ml / min

449 511 53045 10

16-09-98

Detektion 280 nm

Rechromatografie von Fraktion 23 mit der gleichen Säule und einem flacheren Gradient (siehe Bild):

Puffer A: 0.1 % TFA

Puffer B: Acetonitril mit 0.1 % TFA

Gradient: 0-20 %B in 5 Min

20 -50 %B in 45 Min

Detektion: 214 nm

Rechromatografie von Fraktion 16 aus dem vorangegangenem Trennschritt mit der gleichen Säule, aber anderem Elutionsmittel, um die Selektivität bei der Trennung zu verändern.

Puffer A: 0.1 % TFA

Puffer B: 0.1 %TFA in Methanol

Gradient: 0 - 40% B in 5 min

40 - 70 % B in 45 min

Detektion: 214 nm

chromatografie der aktiven Fraktion 21 mit einer Kationenaustausch HPLC:

Säule: Parcossil Pepkat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek, Heidelberg

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer pH 4.5

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Fluß: 0.75 mL/min

Gradient: 0-15 % B in 5 min

15-50% B in 35 min

Die erhaltenen Fraktionen wurden jede einzeln in einem kurzen Reverse Phase HPLC Lauf entsalzt, bevor sie zum Test auf antimikrobielle und bifidogene Aktivität zugeführt wurde.

16.09.97

Fraktion 9 enthielt die reine, bifidogene Komponente casein- $\kappa$ -63-117. Fraktion 10 enthält die bifidogene Komponente

GRRRSVQWCAVSQPEATKOFOWCRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCQA neutrophil-lactoferrin-20-67

und Fraktion 11 enthält die bifidogene Komponente mit einer Adduktmasse von +16 was darauf hindeutet, daß es sich um ein Oxidationsprodukt handelt (wahrscheinlich ein Methionin oxidiert).

Alle diese Peptide haben eine bifidogene Aktivität. Auch das Oxidationsprodukt wirkt sichermaßen.

### **Beispiel 3:**

#### *Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf E. coli*

Fraktionen aus der HPLC wurden mit *E. coli* K12 eingesetzt. Der Test wird als in 3 g/ 1 Tryptic Soy broth (Sigma) folgendermaßen durchgeführt:

für jeden Assay wurden Kulturen von *E. coli* K12 frisch in Tryptic Soy broth (Sigma) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 16 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung bestehend aus 200 µl 3 g / 1 Tryptic Soy broth in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug hier 0.05 bei 550 nm gemessen. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt. Die Trübung von unbehandelten Bakterien wurde jeweils auf 100 % normiert.

49 511 53045 10

16-09-98

**Beispiel 4:***Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf *Bifidobacterium bifidum**

Für jeden Assay wurden Kulturen von *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 frisch in Elliker broth (Difco, Detroit, USA) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter anaeroben Bedingung bei 37°C für 16 - 18 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung bestehend aus 200 µl 50 % Elliker broth in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug hier 0.05 bei 550 nm gemessen. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt. Die Trübung von unbehandelten Bakterien wurde jeweils auf 100 % normiert. Als Positivkontrolle diente N-acetylglucosamin. Für diesen Test können nur Bifidus-Kulturen eingesetzt werden, die auf N-acetylglucosamin reagieren. Nach einigen Passagen verlieren Bifidobakterien diese Eigenschaft, diese können dann für diesen Wachstumstest nicht mehr eingesetzt werden.

**Abbildungen:**

**Abb. 1:** Der erste Trennschritt wurde mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12.5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Fraktion 23 enthielt humanes casein- $\kappa$ -63-117 mit einer starken Aktivität.

**Abb. 2:** Rechromatografie von Fraktion 23 (Bild 1) mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12.5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) und einem flacheren Gradienten.

**Abb. 3:** Rechromatografie von Fraktion 16 aus dem vorangegangenem Trennschritt (Bild 2) mit der gleichen Säule, aber anderem Elutionsmittel (Methanol), um die Selektivität bei der Trennung zu verändern.

**Abb. 4:** Rechromatografie der aktiven Fraktion 21 (Bild 3) mit einer Kationenaustausch HPLC (Säule: Parcosil Pepkat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek; Heidelberg) Fraktion 9 enthielt die reine Komponente casein- $\kappa$ -63-117. Fraktion 10 enthält die Verbindung gemäß Claim 20 und Fraktion 11 enthält die Verbindung gemäß Claim 20 in einer oxidierten Form (+16 Dalton)

**Claims**

1.

Peptide mit der Eigenschaft, daß sie aus Menschen- und Kuhmilch gewonnen werden, können mit der Eigenschaft, daß sie ein Molekulargewicht von 250 - 7000 Dalton aufweisen,

mindestens 2 basische Aminosäuren (Lysin oder Arginin) enthalten,

In einem kombinierten Wachstumstest eine Veränderung in der Keimzahl gegenüber wirkstofffreien Kontrollen bei einer Inkubationszeit von mindestens 16 Stunden feststellbar ist, bei Verwendung von Bifidobakterium bifidum in 50 % Elliker Broth bei einer Dosis von 200 µg/ml  $\geq -25\%$  beträgt und gleichzeitig bei dieser Dosis die Wirkung auf E. coli in 3 g / 1 Tryptic Soy Broth  $\leq -75\%$  beträgt.

Oder alternativ: In einem kombinierten Wachstumstest eine Veränderung in der Keimzahl gegenüber wirkstofffreien Kontrollen bei einer Inkubationszeit von mindestens 16 Stunden feststellbar ist, die bei Verwendung von Bifidobakterium bifidum in 50% Elliker Broth bei einer Dosis von 200 µg/ml  $\geq +20\%$  beträgt und gleichzeitig bei dieser Dosis die Wirkung auf E. coli in 3 g / 1 Tryptic Soy Broth  $\leq +5\%$  beträgt.

se Bedingungen werden als bifidogen bezeichnet.

2. Eine Methode zur Herstellung von bifidogenen Peptiden, gemäß Anspruch 1, mit der Handlungsanweisung

- Kuhmilch oder Human-Milch mit Proteasen zu versetzen und für mindestens 2 Stunden zu inkubieren
- Zentrifugation, um Fett abzuschöpfen

- Ansäuern auf einen pH von 2.0 mittels TFA oder HCl, um weitere Proteine zu fällen
- Anwendung mindestens zwei Reverse-Phase-HPLC Schritten zur Anreicherung
- Anwendung mindestens eines Kationenaustausch-HPLC-Schrittes, wobei das Eluat vor den biologischen Wachstumstests auf einen Salzgehalt <25 mM gebracht wird (Dialyse oder RP-HPLC).
- Testung des Wachstums von *E. coli* in 3 g/l Tryptic Soy broth und gleichzeitig Testung des Wachstums von Bifidobakterien in 50 % Elliker Broth, mit Bestimmung der Keimzahl oder der korrespondierenden Mediumtrübung im Photometer.
- Auswahl der Fraktionen gemäß der bifidogenen Eigenschaften genannt in Anspruch 1

Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

**bovines Casein- $\alpha_1$ -111-118:** EQLLRLKK

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosyierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

**bovines Casein- $\alpha_1$  -109-119:** YLEQLLRLKKY

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosyierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

49 511 53045 10

16.09.98

5. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Casein- $\alpha_1$ -50-57: NRQRNILR

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

6. Ein bifidogenes Peptid mit der Eigenschaft gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Casein- $\alpha_1$ -45-57: YMNGMNRQRNILR

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

7. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Lactoferrin-40-48: FQWQRNMRK

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt

511 53045 10  
16.09.97

fehlt bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

8. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Lactoferrin-136-143: HTGLRRTA

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

9. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Lactoferrin-345-353: FTAIQNLRK

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

9 511 53045 10

16.09.98

10. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Lactoferrin-357-367:

EVAARRARVVW

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

11. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Lactoferrin-42-49:

WQRNMRKV

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

12. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Lysozym-26-33: LARTLKRL

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt

511 53045 10

16.09.98

fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

13. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Casein- $\beta$ -32-39: YKQKVKEKV

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

14. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Albumin-432-439: LVRVYTKKV

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

15. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Albumin-161-169: KYLYEIARR

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt

18.09.98

fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

16. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humanes Lactoferrin-(360-371)-(400-403):

**ARRARVVWCAVG**  
|  
**CIAL**

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

17. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humanes Lactoferrin -(360-372)-(400-403):

**ARRARVVWCAVGE**  
|  
**CIAL**

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

511 53045 10

16.09.97

## 18. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humane Casein- $\kappa$ -63-117:

YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen, um 50 % verkürzte Fragmente und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

## 19. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

GRRRSVQWCTVSQPEATKOFQWGRNMRRVRGPPVSCIKRDSPIQCQA lactoferrin-20-68 (30T,48R)

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

## 20. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

GRRSVQWCACVSQPEATKOFQWGRNMRKVRGPPVSCIKRDSPICCQA neutrophil-lactoferrin-20-67

49 511 53045 10

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

21. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

GRFFRSVQWC AVSQPEATKCFQWQRNMRKV RGPPVSCIKRDSPIQCIQA lactoferrin-20-68

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

22. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

vines Casein- $\alpha_{s2}$ -198-222:

VYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

16.09.96

23. Ein bifidogenes Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mit der Aminosäuresequenz

humanes Lactoferrin -360-371 (Cys368Ala):

**ARRARVVWAAVG**

sowie deren biologisch aktive Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte, oxidierte, und/oder glykosylierte Formen und Peptide, die diese Aminosäuresequenz enthalten mit der Eigenschaft, daß wenn genau dieser Sequenzabschnitt fehlt keine bifidogene Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mehr feststellbar ist, d.h. dieser Sequenzabschnitt diese biologische Eigenschaft wesentlich determiniert hat.

24. Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die in den Ansprüchen 1 bis 23 genannt sind mit bifidogener Eigenschaft gemäß Anspruch 1 mit Hilfe von genetisch manipulierter Organismen unter Verwendung von Expressionsvektoren, sowie deren multiple chemische Synthese als Einzelsubstanzen oder miteinander verkettet als Polypeptid.

25. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern und Antagonisten gegen in den Ansprüchen 1-23 genannten Peptide gerichtet zur Modulation einer bakteriellen Flora.

Rezeptur für ein Nahrungsmittel, mit definierten Mengen der in den Ansprüchen 1-23 genannten Peptide einzeln oder in Kombination.

27. Ein Arzneimittel mit definierten Mengen der in den Ansprüchen 1-23 genannten Peptide einzeln oder in Kombination zur Behandlung von mikrobieller Fehlbesiedlung, d.h. durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien bedingten Erkrankungen wie Infektionen, Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren (z.B. Ulcera des Magens), mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen (z.B. Gefäßveränderungen), Durchfallerkrankungen und Koliken, Abweichungen der Mund-, Darm und Vaginalflora, Karies.

49 511 53045 10

16.09.97

28 Ein Behandlungsschema, die in den Ansprüchen 1-23 genannten Peptide einzeln oder in Kombination verwendete, zur Behandlung von durch Fehlbesiedlung mit Mikroorganismen ausgelösten Erkrankungen.

29 Ein Diagnostikmittel die Stoffe gemäß Ansprüche 1-23 enthaltend zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis -Spiegeln dieser Substanzen.

30 Eine Methode, wobei eine therapeutische Wirkung der Polypeptide aus Anspruch 1-23 durch Gabe von DNA kodierend für die individuellen Polypeptide oder für Heteropolymere dieser einzelnen Polypeptide und seine Expression in vivo beim Menschen oder beim Rind erreicht wird.

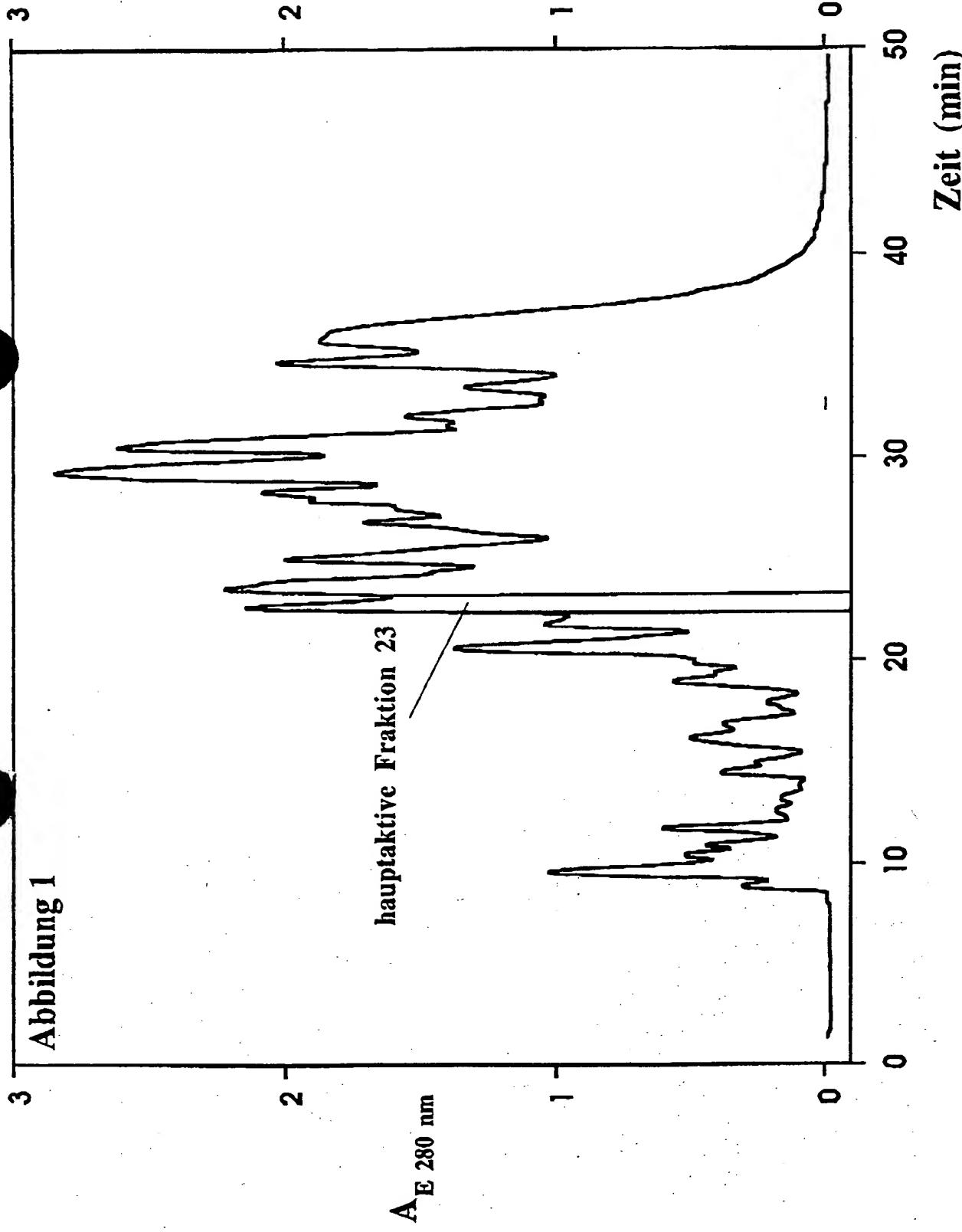
16-09-1997 09:37

Haemopep Pharma GmbH

+49 511 53045 10 S.23

511 53045 10

16.09.96



Empfangszeit 16.Sep. 9:29

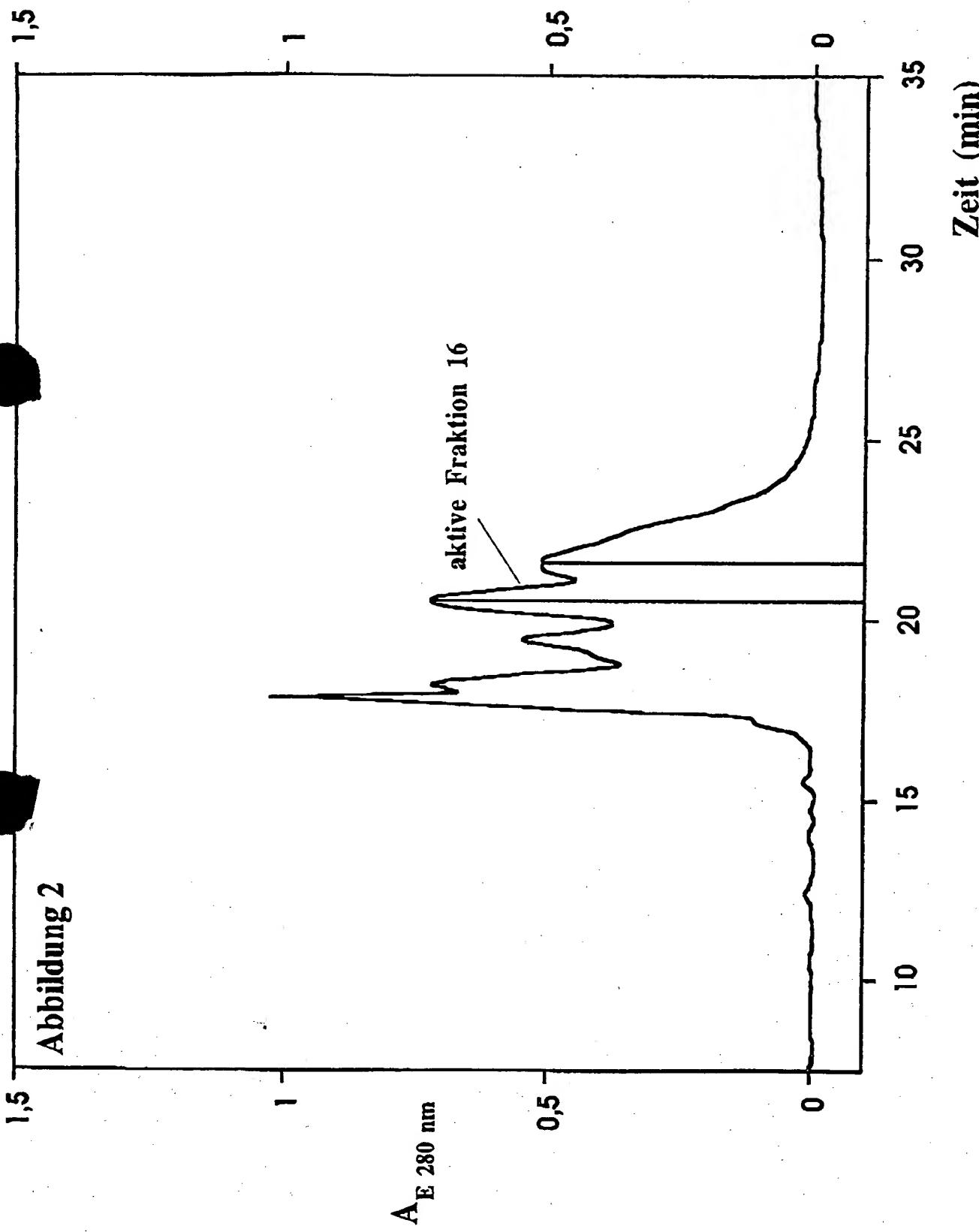
16-09-1997 09:38

Haemopep Pharma GmbH

+49 511 53045 10 S.24

+49 511 53045 10

16.09.98



Empfangszeit 16.Sep. 9:29

16-09-1997 09:38

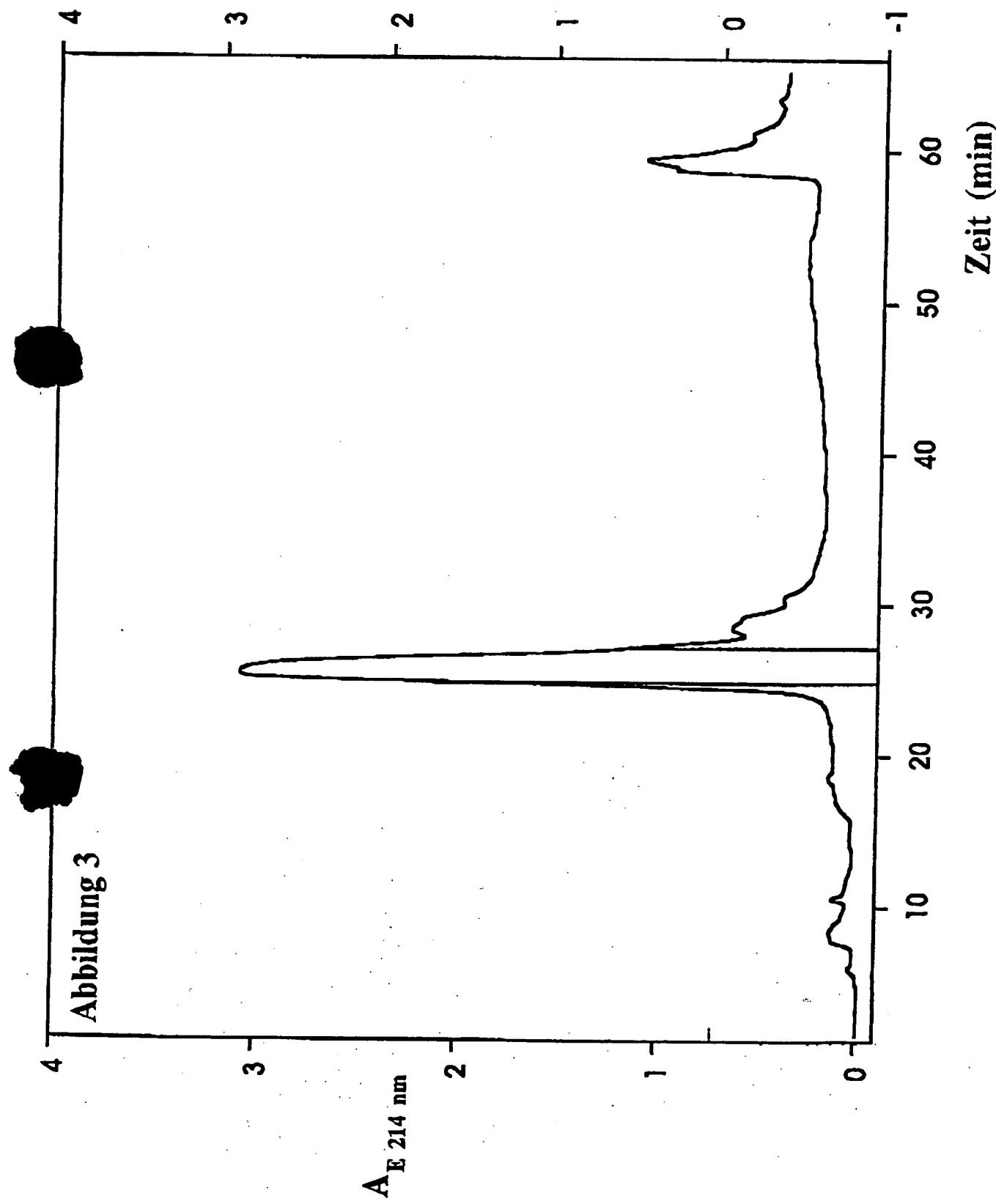
Haemopep Pharma GmbH

+49 511 53045 10 S. 25

9 511 53045 10

16.09.97

Abbildung 3



49 511 53045 10

16.09.97  
6